

CO

(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 39 35 098 A 1

(51) Int. Cl. 4:
B 01 D 15/08
C 07 H 21/04
G 01 N 30/48

- (71) Anmelder:
Macherey-Nagel GmbH + Co KG, 5160 Düren, DE
- (74) Vertreter:
Klöpsch, G., Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anw., 5000 Köln

- (72) Erfinder:
Sebastian, Imrich, Dipl.-Chem. Dr., 5160 Düren, DE;
Sieber, Manfred, Dipl.-Chem. Dr., 5168 Schmidt, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

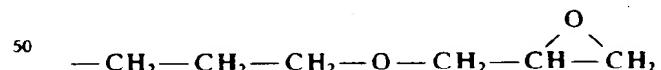
- (54) Trägermaterial und seine Verwendung in einem Verfahren zur chromatographischen Trennung von Nukleinsäuren

Die Erfindung betrifft ein chromatographisches Trägermaterial, dessen Hohlräume die ein- bis zwanzigfache Größe der größten Abmessung der zu trennenden Nukleinsäuren aufweisen, welches dadurch erhältlich ist, daß ein Ausgangsträgermaterial einer Hohlräumgröße von 10 bis 1000 nm, einer spezifischen Oberfläche von 5 bis 800 m²/g und einer Korngröße von 3 bis 500 µm mit einem Silanisierungsreagenz umgesetzt wird, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das Silanisierungsreagenz mindestens eine bereits mit einem primären oder sekundären Hydroxialkylamin umgesetzte reaktive Gruppe aufweist oder eine mit einem Hydroxialkylamin umsetzbare reaktionsfähige Gruppe wie eine Epoxigruppe oder Halogenatome enthält, die in einer weiteren Reaktionsstufe mit einem Hydroxialkylamin zur Reaktion gebracht wird.

DE 39 35 098 A 1

Beschreibung

- Die Erfindung betrifft ein Trägermaterial sowie seine Verwendung in einem Verfahren zur chromatographischen Trennung von Nukleinsäuren.
- 5 Eine rasche und systematische Trennung und Isolierung von Nukleinsäuren ist eine in zahlreichen Bereichen der Biowissenschaften, insbesondere auf dem Gebiet der Gentechnologie, anzutreffende Notwendigkeit. Dabei ist häufig die Isolierung einer einzigen Nukleinsäurespezies aus einem Gemisch von oft mehr als 100 durchzuführen.
- 10 Die bekannten Chromatographieverfahren waren jedoch hinsichtlich der erreichbaren Auflösung und Geschwindigkeit der Trennung in die einzelnen Molekülspezies nicht befriedigend.
- 15 In der US-A 40 29 583 wurde ein zur Trennung von Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren geeignetes chromatographisches Trägermaterial aus Silikagel beschrieben, welches einen Hohlraumdurchmesser von bis zu 50 nm aufweist, und an das mittels eines Silanisierungsreagenzes eine stationäre Phase mit Anionen- oder Kationenaustauscher bildenden Gruppen gebunden ist, die mit den zu trennenden Substanzen in Wechselwirkung treten. Das silanisierte Silikagel wird mit Wasser in Berührung gebracht, wobei die Gefahr besteht, daß die stationäre Phase polymerisiert und die Poren des Trägermaterials schließt.
- 20 Gemäß der EP-B 01 04 210 können Nukleinsäuregemische mit hoher Auflösung und bei hoher Durchsatzgeschwindigkeit in ihre Bestandteile aufgetrennt werden, wenn ein chromatographisches Trägermaterial verwendet wird, bei dem der Durchmesser der Hohlräume das ein bis zwanzigfache der größten Abmessung der jeweils zu isolierenden Nukleinsäure oder der größten Abmessung der größten aller im Gemisch enthaltenen Nukleinsäuren beträgt. Zur Herstellung des chromatographischen Trägermaterials wird dieses zunächst mit einem Silanisierungsreagenz umgesetzt, welches eine flexible Kettengruppe aufweist, die ihrerseits wiederum durch Reaktion mit einem Anionen- oder Kationenaustauscher bildenden Reagenz zum fertigen Trägermaterial umgewandelt wird.
- 25 Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die chromatographische Trennung von biologischen Makromolekülen wie langketten Oligonukleotiden, hochmolekularen Nukleinsäuren, t-RNS, 5SrRNS, 16S/23SrRNS, einsträngiger DNS (z.B. M13), doppelsträngiger DNS (z.B. Plasmiden und Bruchstücken genetischer DNS) mit gegenüber den Trennmöglichkeiten nach dem Stand der Technik verbesserter Auflösung bei hoher Durchsatzgeschwindigkeit zu ermöglichen. Die verwendeten Trägermaterialien sollen dabei in einem weiten Temperaturbereich einsetzbar sein und eine hohe Beladbarkeit ermöglichen. Weiterhin sollen hohe Anforderungen an Druckbeständigkeit und damit lange Lebensdauer des Trägermaterials erfüllt sein. Das Material soll zudem eine schnelle Gruppentrennung der Nukleinsäuren ohne Verwendung aufwendiger und kostenintensiver Apparaturen wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographieanlagen oder Ultrazentrifugen ermöglichen.
- 30 Diese Aufgabe wird überraschend durch die Bereitstellung eines chromatographischen Trägermaterials gelöst, dessen Hohlräume die ein bis zwanzigfache Größe der größten Abmessung der jeweils zu isolierenden Nukleinsäuren aufweisen, welches dadurch erhältlich ist, daß ein Trägermaterial einer Hohlraumgröße von 10 bis 1000 nm, einer spezifischen Oberfläche von 5 bis 800 m²/g und einer Korngröße von 3 bis 500 µm mit einem Silanisierungsreagenz der allgemeinen Formel R₁R₂R₃SiR₄ umgesetzt wird, wobei R₁ ein Alkoxirest mit 1 bis 10 C-Atomen oder ein Halogenatom oder eine Dialkylaminogruppe mit Alkylresten mit 1 bis 6 C-Atomen ist, R₂ und R₃ ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 10 C-Atomen oder ein Alkoxirest mit 1 bis 10 C-Atomen oder ein Halogenatom oder ein durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochener Alkylrest mit 4 bis 20 C-Atomen ist, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach durch Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Hydroxy oder Aryl substituiert sein kann und R₄ eine Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 20 C-Atomen oder ein durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochener Alkylrest ist, wobei dieser Rest ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxi substituiert sein kann, insbesondere



und wobei die die Wechselwirkung mit der zu trennenden Substanz bewirkende flexible Kettengruppierung, die vorzugsweise eine Epoxigruppe trägt, anschließend durch Reaktion mit einem Hydroxialkylamin modifiziert wird.

Erfnungsgemäß kann das Silanisierungsreagenz auch eine bereits mit einem primären oder sekundären Hydroxialkylamin umgesetzte reaktive Gruppe aufweisen.

Die Wahl des Hydroxialkylamins, wie Aminoethanol, Diethanolamin, N-Methylaminoethanol, 1,3-Aminopropanol, 1,4-Aminobutanol, usw., ermöglicht die Variation der Basizität der Ionenaustauschergruppe und damit eine Optimierung für das jeweilige Trennproblem.

Als Träger kommen Kieselgel, Aluminiumoxid, Titandioxid, poröses Glas oder Harze in Betracht. Die Größe der einzusetzenden Trägerpartikel liegt – entsprechend dem Erfordernis, dem Fluß des Eluenten nur einen geringen Widerstand entgegenzusetzen – vorzugsweise im Bereich von 50 bis 500 µm, weiter bevorzugt im Bereich von 50 – 200 µm.

65 Die nach dem Stand der Technik häufig verwendeten Diethylaminoethyl (DEAE)-Gruppierungen als Anionenaustauschergruppen ermöglichen – aufgebracht auf makroporöse Kieselgelpartikel mit einem Durchmesser von 100 bis 200 µm – nur einen relativ geringen Bereich für die Elution einzelner Nukleinsäureklassen, wie z.B. Transfer-RNS, Messenger-RNS und einzel- oder doppelsträngiger DNS. Mit 0,4 Mol/l (von 0,25M bis 0,65M

KCl) ist dieser Bereich für eine stufenweise Elution der Nukleinsäureklassen zu gering, wie sich aus dem nachfolgenden Beispiel ergibt.

Die chemische Modifizierung durch Bindung von Hydroxialkylaminen auf dem Träger kann in ein- oder zweistufiger Reaktion erfolgen.

Bei einstufiger Reaktion wird der anorganische Träger mit einem Alkoxisilan, das die Hydroxialkylamingruppen bereits enthält, umgesetzt.

Bei der zweistufigen Reaktion erfolgt zunächst eine Umsetzung des Trägers mit einem Alkoxi- oder Chlorsilan, welches reaktionsfähige Gruppen (z.B. Epoxigruppen, Halogenatome, u.s.w.) enthält, und in nachfolgender Reaktion wird das entsprechend der gewünschten Basizität ausgewählte Hydroxialkylamin eingeführt.

Die Silanisierung mit Alkoxisilanen geschieht vorteilhaft mit Hilfe von Katalysatoren wie Butylamin oder metallorganischen Verbindungen unter gemilderten Reaktionsbedingungen.

Organische Träger müssen eine reaktionsfähige Gruppe, z.B. eine Epoxigruppe, enthalten, an der in nachfolgender Reaktion die Hydroxialkylamine gebunden werden.

Das erfindungsgemäße Trägermaterial eröffnet die Möglichkeit, ohne aufwendige technische Einrichtungen einzelne Klassen biologischer Makromoleküle wie Nukleinsäuren unter Verwendung eines Stufengradienten aus einem komplexen Gemisch aufzureinigen.

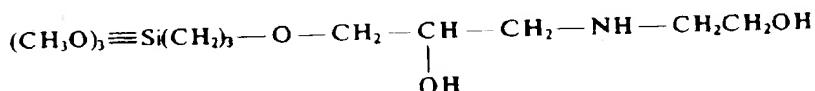
Beispielsweise gelingt es, mit mittels Aminoethanol modifiziertem makroporösem Kieselgel einer Partikelgröße von 100 bis 200µm, Nukleinsäuregemische durch eine Salzkonzentrationserhöhung im Eluenten um ca. 1,0 Mol/l in verschiedene Gruppen aufzutrennen, wie es dem rechten Chromatogramm der Figur am Beispiel von tRNS (Peak 1), rRNS (Peak 2) und Bruchstücken genomischer DNS (Peak 3) gezeigt wird.

Das Trennverfahren eignet sich bevorzugt zur Trennung von Oligo- und Polynukleotiden im Größenbereich von 30 – 50 000 Basen. Vorteilhaft werden die Puffer-, pH- und Temperaturbedingungen für die zu isolierende Spezies optimiert. Bei geringeren Salzkonzentrationen bis zu 0,3 Mol/l können gleichzeitig Polysaccharide, Proteine und niedermolekulare zelluläre Substanzen eluiert werden.

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele veranschaulicht:

Beispiel 1

50 g Kieselgel einer spezifischen Oberfläche von 10 m²/g und einem mittleren Porendurchmesser von 400 nm werden 12 Stunden bei 170°C getrocknet, mit 300 ml getrocknetem Xylol, 15 ml Silan der Formel



und 0,5 ml Butylamin als Katalysator versetzt, zwei Minuten lang mit Ultraschall behandelt und bei 130°C 3 Stunden unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit gehalten. Das modifizierte Kieselgel wird abfiltriert, mehrmals mit Methylenechlorid, Methanol/Wasser (1 : 1), Methanol und Methylenchlorid gewaschen und bei 105°C getrocknet.

Beispiel 2

50 g getrocknetes Kieselgel einer spezifischen Oberfläche von 22 m²/g und einem mittleren Porendurchmesser von 100 nm werden mit 300 ml getrocknetem Xylol, 15 ml γ-Glycidyloxipropyltrimethoxsilan und 0,5 ml Dibutylzinndilaurat versetzt, 2 Minuten lang mit Ultraschall behandelt und 4 Stunden unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit bei 125°C gehalten. Das modifizierte Kieselgel wird mehrmals mit Methylenchlorid, Methanol und Methylenchlorid gewaschen und bei 105°C getrocknet.

Das Produkt wird anschließend mit 300 ml Tetrahydrofuran und 15 ml N-Methylaminoethanol versetzt und 16 Stunden lang unter Luftfeuchtigkeitsausschluß gekocht. Das Produkt wird entsprechend Beispiel 1 gewaschen und getrocknet.

Beispiel 3

30 g Glycidylgruppen enthaltendes Harz (Polymerträger VA-Epoxy Biosynth®, Riedel-de Haen) werden mit 200 ml getrocknetem Tetrahydrofuran und 10 ml Diethanolamin versetzt und 16 Stunden lang unter Rückfluß und Ausschluß von Luftfeuchtigkeit gekocht und entsprechend Beispiel 1 gewaschen und getrocknet.

Beispiel 4

50 g mit porösem Siliciumdioxid überzogene Glaskugeln einer spezifischen Oberfläche von 10 m²/g werden wie in Beispiel 2 mit γ-Glycidyloxipropyltrimethoxsilan umgesetzt, gewaschen und getrocknet.

Das Produkt wird anschließend mit 300 ml getrocknetem Tetrahydrofuran und 15 ml Aminoethanol versetzt und 16 Stunden unter Rückfluß und Ausschluß von Luftfeuchtigkeit gekocht und entsprechend Beispiel 1 gewaschen und getrocknet.

Beispiel 5

5 a) 0,07 g des erfundungsgemäß modifizierten Endproduktes aus Beispiel 1 wurden trocken in eine Stahlsäule (15 x 4 mm) gepackt und in einer HPLC-Anlage auf das Bindungs- und Elutionsverhalten von Nukleinsäuren untersucht.

Bei einem Fluß von 1 ml/min, einer Detektorwellenlänge von 265 nm wurden 5 µl Nukleinsäuregemisch (tRNS [E. coli], rRNS [E. coli], dsDNS [calf thymus]) injiziert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 100% Eluent A (50 mM Tris/H₃PO₄, 20% C₂H₅OH, 4 M Harnstoff, pH 7,0) auf 100% Eluent B (50 mM Tris/H₃PO₄, 20% C₂H₅OH, 4 M Harnstoff, 1,8 M KCl, pH 7,0) in 10 Minuten. Das erhaltene Chromatogramm ist 10 in der rechten Hälfte der Figur dargestellt.

10 Eine deutliche Auf trennung der Gemischkomponenten ist zu erkennen.
(Tris = Trishydroxymethylaminomethan)

b) Vergleichsbeispiel

15 0,07 g Kieselgel, modifiziert gemäß EP-B-01 04 210 mit Diethylaminoethanol (gleiches Ausgangskieselgel wie unter Beispiel 5a) wurden ebenfalls trocken in eine Stahlsäule (15 x 4 mm) gepackt und in einer HPLC Anlage auf das Bindungs- und Elutionsverhalten von Nukleinsäuren wie unter Beispiel 5a untersucht.

20 Das Ergebnis ist im linken Chromatogramm der Figur dargestellt, die Peaküberlagerung zeigt, daß es nicht zu einer sauberen Auf trennung der Gemischkomponenten kommt.

Patentansprüche

- 25 1. Chromatographisches Trägermaterial, dessen Hohlräume die ein- bis zwanzigfache Größe der größten Abmessung der zu trennenden Nukleinsäuren aufweisen, welches dadurch erhältlich ist, daß ein Ausgangsträgermaterial einer Hohlraumgröße von 10 bis 1000 nm, einer spezifischen Oberfläche von 5 bis 800 m²/g und einer Korngröße von 3 bis 500 µm mit einem Silanisierungsreagenz umgesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Silanisierungsreagenz mindestens eine bereits mit einem primären oder sekundären Hydroxialkylamin umgesetzte reaktive Gruppe aufweist oder eine mit einem Hydroxialkylamin umsetzbare reaktionsfähige Gruppe wie eine Epoxigruppe oder Halogenatome enthält, die in einer weiteren Reaktionssstufe mit einem Hydroxialkylamin zur Reaktion gebracht wird.
- 30 2. Chromatographisches Trägermaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Grundträgermaterial Kieselgel, Aluminiumoxid, Titandioxid, poröses Glas oder Polymerharzträger ist.
- 35 3. Chromatographisches Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Grundträgermaterial eine Partikelgröße zwischen 50 und 500 µm aufweist.
- 40 4. Chromatographisches Trägermaterial nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Grundträgermaterial ein makroporöses Kieselgel einer Partikelgröße zwischen 100 und 200 µm ist.
- 45 5. Chromatographisches Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die mit dem Hydroxialkylamin bereits umgesetzte oder reaktionsfähige Gruppe, die an das Silanisierungsreagenz gebunden oder darin eingeführt werden kann, die γ-Glycidyloxypropylgruppe ist.
6. Chromatographisches Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das eingeführte Hydroxialkylamin Aminoethanol, Diethanolamin oder N-Methylaminoethanol ist.
7. Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren unter Verwendung der chromatographischen Trägermaterialien gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution unter Verwendung eines Salzkonzentrationsgradienten in einem Salzkonzentrationsbereich größer gleich 1 Mol/l durchgeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Oligo- und Polynukleotide im Größenbereich von 30 bis 50 000 Basen getrennt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution unter für die isolierenden Spezies optimalen Puffer-, pH- und Temperaturbedingungen durchgeführt wird.
- 50 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig Polysaccharide, Proteine und niedermolekulare zelluläre Substanzen bei Salzkonzentrationen bis zu 0,3 Mol/l eluiert werden.

55 Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

60

65

— Leerseite —

